Beiträge zur Kenntniss der Eiweisskörper der Kuhmilch

Dr. **Karl Storch,**

a. o. Professor und Adjunct am k. u. k. Militär-Thierarznei-Institute in Wien.

Aus dem physiologischen Laboratorium des k. u. k. Militär-Thierarznei-Institutes in Wien.

Die älteren Anschauungen über die Natur des Caseïns, des wichtigsten Eiweisskörpers der Milch, haben durch die neuesten Forschungen eine wesentliche Umgestaltung erfahren. Dass das Caseïn eine einheitliche Substanz ist, gilt gegenwärtig als erwiesen. Welche Eiweisskörper ausser dem Caseïn in der Milch vorkommen, ist noch nicht entschieden. Im Jahre 1880 (Zeitschr. für Physiologie, 7) suchten noch Danilewsky und Radehousen zu beweisen, dass das Caseïn ein Gemenge von Caseoalbumin und Alkalialbuminaten darstellt. Das Caseoalbumin sei mit dem Serumalbumin identisch. Gegen diese Ansicht wendet sich (ebendaselbst) Hammarsten, welcher die Einheitlichkeit des Caseïns sicherstellt.

Duclaux (Compte-rendue, 98, 1884) hält das Caseïn, im Gegensatz zu den meisten Forschern, nicht für einen einheitlichen Stoff, sondern nimmt drei Caseïne an: die feste Form (das Caseïn der Autoren), die colloidale Form (Albumin und Pepton) und die lösliche Form.

E. Pfeifer (Maly's Fortschr. der Chemie, 1884) leugnet das Vorhandensein anderer Eiweisskörper ausser dem Caseïn in der Milch. Das Caseïn werde durch Säuren, Lab und Alkohol in mehrere Modificationen, zu welchen das Caseïn *a* (Caseïn der Autoren), das Caseïn *b* (das Milchalbumin), das Caseïn *c*

(spontan gerinnendes Caseïn) und das nicht coagulirbare Caseïn *d* gehören, zerlegt.

S. Schmidt (Maly's Fortschr. der Chemie, 1884) wies in der Frauen- und Kuhmilch Caseïn, Albumin und Hemialbumose nach.

Sebelien (Zeitschr. für physiolog. Chemie, 9, 1886) brachte das Caseïn durch Eintragen von Chlornatrium in die Milch zur Ausscheidung. Durch Sättigung des Filtrates mit Magnesiumsulfat wurde eine zweite Eiweisssubstanz, das Lactoglobulin, ausgesalzen. Das Filtrat des Lactoglobulins enthält noch einen dritten, mit Essigsäure fällbaren Körper, das Lactalbumin.

Hammarsten (Milchzeitung, 1888) unterschied das in der Milch gelöste Caseïn von dem durch Lab coagulirten. Neben dem letzteren spaltet sich in Folge der Labwirkung von dem Caseïn noch eine albumoseartige Substanz, das Molkeneiweiss ab. Das durch Lab coagulirte Caseïn nannten Schulze und Röse Paracaseïn oder Käse, eine Bezeichnung, welche auch von Hammarsten und Anderen adoptirt worden ist.

Söldner (Landwirthsch. Versuchst., 35, 1889) hält das Caseïn für eine starke Säure, welche mit einer Base, und zwar mit Kalk zu einem Salz in der Milch verbunden ist.

Halliburton (Journal of physiol., 1890) beschreibt in der Milch gegenüber Sebelien nur zwei Eiweissstoffe, das Caseïn, von ihm Caseïnogen genannt, und das Lactalbumin. Zur Darstellung des Caseïns bedient er sich des Magnesiumsulfats. Das Caseïn steht nach ihm zwischen Albuminaten und Globulinen. Von letzteren unterscheidet es sich dadurch, dass es in der Siedehitze nicht gerinnt. Das Lactalbumin ist vom Serumalbumin verschieden.

Sebelien (Maly's Fortschr. der Chemie, 1891) hält Halliburton gegenüber an dem Vorkommen des Lactoglobulins in der Milch fest.

Zu demselben Resultate wie Sebelien gelangte auf einem anderen Wege auch Arthus (Arch. de physiol., 1893). Er fällt das Caseïn mit Essigsäure. In dem Filtrate bleibt noch ein coagulirbarer Körper zurück. Dass es sich hier um Lactoglobulin und Albumin handelt, ergibt sich aus Folgendem: Trennt er das Milchserum durch Filtration vom Caseïn und

sättigt er das Filtrat mit Magnesiumsulfat, so scheidet sich das Lactoglobulin ab, während das Lactalbumin noch gelöst bleibt. Man kann nach Arthus das Caseïn auch mit Lab zur Ausscheidung bringen, das Filtrat mit Magnesiumsulfat oder Chlornatrium ausfällen und in dem Filtrate des so ausgeschiedenen Lactoglobulins das Albumin mittelst Essigsäure und Kochen bestimmen.

Nach Béchamp (in Maly's Fortschr. der Chemie, 1890) enthält die Milchmolke nach der Ausscheidung des Caseïns mit Essigsäure noch Lactalbumin und Galactozymose. Das Lactalbumin wird aus der Caseïnmolke mit Alkohol gefällt und ist im Wasser unlöslich, während die Galactozymose im Wasser löslich ist.

Söldner (Maly's Fortschr. der Chemie, 1895) stellt eine basische Caseïnverbindung mit 2·39% Kalkgehalt und eine neutrale mit 1·55% Kalkgehalt auf. Courant hat endlich noch eine saure Verbindung des Caseïns mit dem Kalk in der Milch nachgewiesen.

Die Frage, ob das Caseïn ein einheitlicher Körper ist und welche Bedeutung ihm zukommt, wurde am gründlichsten schon im Jahre 1884 von Hammarsten (l. c.) studirt. Den Beweis für die Einheitlichkeit des Caseïns führt Hammarsten damit, dass er neutrale Caseïnlösungen, welche er durch Versetzen verdünnter Milch mit sehr schwacher Essigsäure und durch Lösung des Niederschlages mit Natronhydrat gewinnt, mit Chlornatrium oder mit Magnesiumsulfat fällt. Die Fällung ist eine so vollständige, dass im Filtrate keine Spur eines Eiweisskörpers mehr enthalten ist. Das Caseïn ist nach Hammarsten kein Gemenge von Nucleïn mit einem Albuminkörper, sondern es ist ein Nucleoalbumin. Es ist kein Natronalbuminat, wie zuerst Danilewsky angenommen hat.

Auf Grund der Untersuchungen Hammarsten's, Söldner's, Röhmann's u. A. lässt sich die Frage über die chemische Natur des Caseïns gegenwärtig in folgender Weise beantworten: Das Caseïn besitzt den Charakter einer im Wasser unlöslichen Säure, welche mit Alkalien und Erdalkalien im Wasser lösliche Salze bildet. Dass ausser dem Caseïn in der Kuhmilch noch ein zweiter Eiweisskörper,

das Lactalbumin, vorkommt, wird von Niemand mehr bestritten. Ob die Kuhmilch noch einen dritten selbständigen Eiweisskörper enthält und welchen chemischen Charakter er hat, ist trotz der Untersuchungen von Sebelin und Arthus noch nicht vollständig sichergestellt.

Bei den zu beschreibenden Untersuchungen habe ich zunächst verschiedene Neutralsalze, welche der Milch bei verschiedenen Temperaturen zugesetzt wurden, in Anwendung gezogen. Die Salze wurden theils in fester Form, theils in concentrirter Lösung den Milchproben, die auf die Zimmerwärme, auf 50° C. und endlich auf 100° C. erwärmt wurden, zugesetzt. Die Milch selbst wurde theils gesunden, zu Versuchszwecken dienenden Kühen des Thierarznei-Institutes entnommen, theils aus dem Handel bezogen.

Die Milch habe ich möglichst fettarm und frisch zur Untersuchung auf Eiweisskörper verwendet. Das Fett wurde durch 12—20stündiges Aufrahmenlassen und Abschöpfen, oder mittelst der Centrifuge entfernt.

Die Salze habe ich vor ihrer Benützung stets auf ihre Reinheit geprüft und deren Lösungen frisch bereitet.

I. Versuche mit Natriumsulfat.

Erste Versuchsreihe.

Circa 50 cm^3 frischer, alkalisch reagirender Magermilch, spec. Gewicht 1·040, Fettgehalt 0·25 (nach der opt. Methode Feser's) werden mit festem Natriumsulfat übersättigt. Das Salz wird durch Auskrystallisirenlassen aus einer saturirten Lösung, welche auf einen Theil destillirten Wassers drei Theile Glaubersalz enthält und bei 33° C. abgedunstet wird, hergestellt.

Ist die Sättigung der Milch mit dem Glaubersalz erreicht, so bemerkt man bei Zimmertemperatur in ihr eine schwache Fällung, die Milch trübt die Wandungen des Becherglases nicht mehr gleichmässig, sondern mittelst feiner Flöckchen.

Wird die durch das Glaubersalz gefällte Milch auf ein Filter gebracht, so tropft von ihr langsam ein wasserklares Filtrat ab. Über Nacht setzt sich auf dem Filter eine feste, zusammenhängende Masse ab, welche sich vom Filter als Ganzes leicht loslösen lässt.

Eine Probe des Niederschlages, mit destillirtem Wasser gut verrieben und dann im Reagensglase geschüttelt, liefert eine milchähnliche Lösung, welche, neuerdings aufs Filter gebracht, trüb durchfliesst.

Man kann aus dem Versuch den Schluss ziehen, dass der ausgeschiedene Eiweisskörper durch das Natriumsulfat nicht in einen geronnenen Zustand, in welchem er im Wasser unlöslich wäre, versetzt wurde, sondern dass mit ihm nur eine Aussalzung stattgefunden hat.

Das wasserklare Filtrat dieses Eiweissstoffes, mit concentrirter Essigsäure versetzt, gibt in der Kälte eine deutliche Fällung. Dasselbe enthält somit noch einen zweiten Eiweissstoff, über dessen chemischen Charakter später berichtet werden wird. Nach dem Ausscheiden des zuletzt genannten Niederschlages ist in dem klaren Filtrat noch ein dritter Eiweisskörper durch Erhitzen bis zum Kochen nachzuweisen.

Zweite Versuchsreihe.

Der durch das Glaubersalz ausgesalzene und auf dem Filter gesammelte Eiweissstoff wird in eine Reibschale gebracht und mit ebensoviel Wasser, als die zur Untersuchung verwendete Milchmenge beträgt, gut verrieben. Er löst sich darin vollständig. Die milchige Flüssigkeit wird centrifugirt und die sich noch bildende dünne Rahmschichte vorsichtig abgeschöpft. Nun wird Glaubersalz im Überschuss eingetragen und die Flüssigkeit lange und gründlich gerührt. Bei fortwährendem Rühren und Schütteln nimmt die Trübung allmälig zu, bis sie den höchsten Grad erreicht hat. Lässt man nun die Masse 10—12 Stunden stehen, so ballt sich am Boden des Gefässes ein flockiger Niederschlag zusammen. Die über demselben stehende Flüssigkeitssäule ist vollständig klar.

Die von dem Niederschlage abfiltrirte klare Flüssigkeit lässt durch die Essigsäure weder in der Kälte, noch bei der Siedehitze einen Eiweisskörper mehr erkennen. Auch treten in ihr die für die Eiweisskörper charakteristischen Farben nach der Anwendung des Millon'schen Reagens und der Biuretprobe nicht auf.

Der Versuch lehrt, dass der mit dem Natriumsulfat aus der reinen Milch abgeschiedene Eiweissstoff in verdünnten

Salzsolutionen löslich und neuerdings völlig aussalzbar ist, und dass sich durch die wiederholte Aussalzung kein anderer in Wasser löslicher Albuminkörper von ihm abspaltet.

Versetzt man eine wässerige Lösung des Eiweissstoffes mit Essigsäure, so fällt er gänzlich heraus. In seinem Filtrate gelingt keine der vielen Eiweissproben.

Dritte Versuchsreihe.

Zur Beantwortung der Frage, bei welchem Glaubersalzgehalte eine Fällung in der Milch eintritt, liess ich mit Hilfe einer Burette abgemessene Mengen der concentrirten Natriumsulfatlösung auf ein bestimmtes Milchquantum einwirken und suchte das Mischungsverhältniss genau zu fixiren, bei welchem die erste Spur einer Fällung sich zeigt. Das erste Auftreten der Fällung in der Milch ist nicht so leicht festzustellen. Der Niederschlag erscheint nämlich zunächst so fein, dass an der Milch bei oberflächlicher Besichtigung keine Veränderung wahrnehmbar ist. Es gehört eine sehr gute Beleuchtung dazu, um das Auftreten der Fällung nicht zu übersehen.

Da bei der Fällung durch das Glaubersalz die Temperatur der Flüssigkeit eine sehr wichtige Rolle spielt, so wurde auf dieselbe bei den Untersuchungen stets Rücksicht genommen, insbesondere wurde die erste Spur einer Fällung bei der Zimmertemperatur, dann bei 50° C. und endlich bei 100° C. festgestellt.

In der Kälte, d. i. bei der Zimmertemperatur, ruft die concentrirte Natriumsulfatlösung in keinem Mischungsverhältniss eine Fällung in der Milch hervor, selbst dann nicht, wenn nur ein Tropfen Milch auf 10 cm^3 getropft wird.

Werden die Flüssigkeiten längere Zeit hindurch im Wasserbade bei der Temperatur von 50° C. erhalten, so wird Folgendes beobachtet:

8 cm^3	Natriumsulfatlösung und	2 cm^3	Milch bedingen keine Fällung.
8·5 cm^3		1·5 cm^3	
9 cm^3		1 cm^3	
9·5 cm^3		0·5 cm^3	Fällung.
9·8 cm^3		0·2 cm^3	

Wird somit die Milch mit der mehr als zehnfachen Menge der Natriumsulfatlösung versetzt und bis zu 50 C. erwärmt, so tritt in ihr eine Fällung ein.

Zur Prüfung auf die Opalescenz werden die beiden letzten Proben, von denen die eine 9·5 cm^3 Lösung und 0·5 cm^3 Milch, die andere 9·5 cm^3 Lösung und 0·2 cm^3 Milch enthält, dreifach nebeneinander gestellt.

Die Mischung erscheint nach ihrer Bereitung etwas durchscheinend und stark opalisirend.

Die Proben der ersten Reihe werden kalt filtrirt. Sie laufen rasch und vollständig durchs Filter durch und zeigen nach dem Filtriren dieselbe milchige Trübung und Opalescenz wie vor dem Filtriren. Nach 48stündigem Stehen werden sie auf der Oberfläche trüber, unten heller, da eine Aufrahmung stattgefunden hat.

Die Proben der zweiten Reihe werden auf 50° C. erwärmt und bei dieser Temperatur filtrirt. Bei der Erwärmung verschwindet die Opalescenz, aber die Proben erscheinen weniger getrübt und enthalten einen feinflockigen Niederschlag. Nach dem Filtriren sind die Filtrate nahezu klar und zeigen nur schwache Opalescenz.

Die Proben der dritten Reihe werden auf 50° C. erwärmt, einige Stunden in der Kälte stehen gelassen und filtrirt. Die Filtration geht langsamer vor sich und das Filtrat erscheint etwas trüber als das Filtrat der warm filtrirten Proben, jedoch heller als die nicht filtrirten Proben.

Aus dem Verhalten der drei Proben muss man schliessen, dass bei 50° C. eine vollständige Fällung der aussalzbaren Eiweisskörper stattfindet, da man ein nahezu klares Filtrat erhält, ferner dass diese Fällung zum grossen Theil lediglich eine Aussalzung ist, da beim Erkalten der Proben, wenn keine Filtration stattgefunden hat, ein Theil der Körper wieder in Lösung geht und beim Filtriren die starke Trübung des kalten Filtrats bedingt. Es ist jedoch auch eine weitgehendere Veränderung der fällbaren Eiweisskörper da, weil das Filtrat nicht so getrübt ist, wie die ursprünglichen Proben vor dem Erwärmen und somit ein Theil der Eiweisskörper in veränderter Form am Filter zurückgeblieben ist.

Man schliesst in diesen Fällen aus der stärkeren Trübung auf die Lösung einer grösseren Quantität von Eiweisskörpern, weil die Trübung durch die Milchkügelchen bedingt ist, die von den Eiweisskörpern bei ihrer Ausscheidung mitgenommen werden. Gehen die Eiweisskörper wieder in Lösung, so kommen die Kügelchen wieder in die Flüssigkeit, und je mehr solche vorhanden sind, umso mehr Eiweiss ist gelöst und umso trüber ist die Flüssigkeit.

Die Erscheinungen der in verschiedenem Concentrationsverhältniss mit der gesättigten Natriumsulfatlösung gemischten und auf 100° C. erwärmten Milch sind folgende:

9	Theile Lösung und	1	Theil Milch	bedingen	deutliche Fällung.
8		2			
7		3			
6		4			
5		5			Fällung.
4		6			keine Fällung.
3		7			

Damit somit die Milch in der Siedehitze durch die gesättigte Natriumsulfatlösung gefällt wird, muss sie mindestens mit dem gleichen Volum der Lösung gemengt sein. Weniger Lösung als Milch bedingt in der Mischung noch keine Fällung.

Werden die letzten drei gekochten Proben, die also weniger Glaubersalzlösung als Milch enthalten, heiss filtrirt, so erweisen sich die Filtrate milchig trübe, opalisirend, und kocht man sie nochmals einige Minuten und filtrirt abermals, so verliert sich weder die Trübung, noch die Opalescenz.

Kocht man hingegen die ersten vier Proben, in welchen die Natriumsulfatlösung überwiegt, so tritt starke Fällung auf. Ihre heissen Filtrate sind klar und rein und bleiben klar und rein. Lässt man die Proben aber vor dem Filtriren über Nacht stehen und erkalten, so filtriren sie dann sehr langsam und die Filtrate sind schwach getrübt.

Man kann sich diese Erscheinung wohl nur auf die Art erklären, dass man annimmt, ein Theil des bei der Siedehitze ausgeschiedenen Eiweissstoffes habe sich in der erkalteten Flüssigkeit wieder gelöst und die Trübung durch das wieder

suspendirte Fett im Filtrate bedingt, ferner ein anderer Theil sei im coagulirten Zustand am Filter geblieben.

Die Coagulation der mit gesättigter Natriumsulfatlösung gemischten Milch in der Siedehitze ist also unvollständig.

Vierte Versuchsreihe.

1. 2 cm^3 Milch werden mit 6 cm^3 concentrirter Natriumsulfatlösung gemischt, mit einigen Tropfen Hühnereiweiss versetzt und wieder gemischt. Wird die alkalisch reagirende Mischung auf dem Wasserbade auf 100° C. erwärmt, so entsteht in ihr eine starke Coagulation. Das Coagulum, auf dem Filter gesammelt, enthält Hühnereiweiss, Fett und, wie wir dies später sehen werden, auch Lactalbumin (und Globulin). In der Molke sind die übrigen Eiweisskörper der Milch gelöst und lassen sich durch Säuren und durch einige Salze zur Ausscheidung bringen und isoliren.

2. 5 cm^3 Milch werden mit 1 cm^3 Hühnereiweiss gemengt und ohne Zusatz von Natriumsulfatlösung zum Sieden gebracht. Diese Milch gerinnt bei 100° C. so vollständig, dass in der von dem Coagulum durchs Filtriren getrennten klaren Flüssigkeit durch die Essigsäure keine Eiweisskörper ausgeschieden werden können.

3. Mischt man 5 cm^3 Milch mit weniger als 0·5 cm^3 Hühnerweiss und bringt die Flüssigkeit auf dem Wasserbade zum Kochen, so scheiden sich in ihr keine Coagula aus.

Ob also die mit frischem Hühnereiweiss versetzte Milch bei der Siedehitze gerinnt oder nicht, hängt nur von der Menge des zugesetzten Albumens ab. Enthält die Milch mehr als $^1/_5$ Volum von dem Albumen eines Hühnereies, so gerinnt sie vollständig, enthält sie weniger, so gerinnt sie gar nicht.

Diese Versuche bestätigen die Beobachtung Latschenberger's, nach welcher durch die Mischung der Milch mit der dreifachen Menge der concentrirten Natriumsulfatlösung und mit Eiweiss die Gerinnung der Eiweisskörper der Milch bei dieser Mischung in der Siedehitze ausbleibt.

Fünfte Versuchsreihe.

10 cm^3 Milch werden mit 30 cm^3 concentrirter Natriumsulfatlösung gemischt, mit einigen Tropfen Albumen versetzt und auf 100° C. erwärmt. Das coagulirte Albumen wird sammt dem Lactalbumin und mitgerissenen Fett auf dem Filter zurückgehalten, das stark alkalisch reagirende, klare, gelblich gefärbte Filtrat sehr vorsichtig mittelst höchst verdünnter Essigsäure neutralisirt. Nun wird in die Flüssigkeit festes Natriumsulfat im Überschuss eingetragen.

Nach langem Mischen und Rühren trübt sich die klar gewesene Flüssigkeit, bis sie zuletzt eine milchige Beschaffenheit annimmt. In der über Nacht stehen gelassenen Flüssigkeit verschwindet die durch eine feine Fällung bedingte Trübung und statt derselben enthält die klar gewordene Mischung einen flockigen, unten im Gefässe angehäuften Niederschlag.

Durch sehr langsames Filtriren wird der Niederschlag auf dem Filter gesammelt, getrocknet und zu weiteren Versuchen aufgehoben.

Eine kleine Probe des wasserklaren Filtrats nochmals mit festem Glaubersalz übersättigt und geschüttelt, bleibt selbst nach zwölfstündigem Stehenlassen ganz klar. Dagegen ruft tropfenweise und schliesslich bis zur vollständigen Ausscheidung im Überschuss zugesetzte verdünnte Essigsäure in dem Filtrate einen Niederschlag hervor, welcher gesammelt werden kann.

In dem Filtrat dieses Niederschlags ist weder in der Kälte noch in der Siedhitze durch die Essigsäure eine Fällung zu bewirken. Auch die Anwendung der Metaphosphorsäure, des Millon'schen Reagens, der Biuretprobe etc. liefern negative Resultate.

Der Versuch lässt folgende Deutung zu: Der Eiweisszusatz zu der glaubersalzhältigen Milch verursacht nur das Mitreissen des Fettes und, wie wir später sehen werden, auch des Lactalbumins (und des Globulins) bei der Coagulation in der Siedehitze. Durch die gänzliche Entfernung des Fettes aus der Milch wird ein für die chemische Untersuchung auf die Eiweissstoffe etwas hinderlicher Bestandtheil der Milch beseitigt.

Die Eiweissstoffe der Milch werden bei der Coagulation, das Lactalbumin (und Globulin) ausgenommen, nicht ausgeschieden, denn sie sind in dem Filtrate durch die Neutralsalze und durch verschiedene andere Salze aussalzbar und durch die Säuren fällbar.

Das Aussalzen der unter den genannten Umständen coagulirten Milch gelingt nur vollständig bei streng neutraler Reaction der Flüssigkeit. Ist die Flüssigkeit alkalisch, so ist das im Überschuss vorhandene Salz selbst nach stundenlangem Rühren wirkungslos, reagirt aber die Flüssigkeit schwach sauer, so trübt sie sich bevor noch das Salz zugesetzt wird. Die Aussalzung erfolgt zwar dann umso rascher, aber man weiss zuletzt nicht, wieviel von den ausgeschiedenen Eiweisskörpern auf Rechnung der Säure und wieviel auf Rechnung des Salzes zu setzen ist.

Wird somit das auf die angegebene Weise bereitete Milchfiltrat streng neutralisirt, so lässt sich in demselben ein Theil der gelösten Eiweissstoffe aussalzen, der andere Theil bleibt gelöst und kann mittelst Säuren gefällt werden.

Das Neutralisiren geschah stets mit einer äusserst schwach mit Essigsäure angesäuerten, concentrirten Natriumsulfatlösung. Die neutralisirte Flüssigkeit blieb klar und durchsichtig wie vor dem Neutralisiren.

Während, wie wir gesehen haben, durch das Natriumsulfat ein Eiweissstoff aus der Milch ausgesalzen wird, bleibt in dem Filtrat desselben noch eine Eiweisssubstanz gelöst, welche durch überschüssige Essigsäure in der Kälte fällbar ist. Die zu ihrer vollständigen Fällung nöthige Menge Essigsäure ist eine sehr grosse.

Wird eine kleine Probe der mit Essigsäure gefällten und auf dem Filter zurückgehaltenen Substanz mit destillirtem Wasser fein verrieben, so entsteht eine milchig-trübe, aber klar filtrirende Flüssigkeit, in welcher die Substanz also nicht gelöst ist. Es ist dies eine von dem aussalzbaren Eiweissstoff verschiedene Substanz, von welcher noch zu entscheiden ist, welchen chemischen Charakter sie besitzt.

Dass die Substanz im Wasser unlöslich ist, ergibt sich noch aus den nachfolgenden Versuchen:

1. Suspendirt man eine kleine Probe der Substanz in destillirtem Wasser, lässt abfiltriren und versetzt das Filtrat mit Essigsäure, so entsteht keine Trübung.

2. Kocht man das bis zur kaum merklichen sauren Reaction abgestumpfte Filtrat, so trübt es sich nicht.

3. Versetzt man das wässerige Filtrat mit dem Millon'schen Reagens und kocht, so erscheint die Flüssigkeit nach dem Erkalten nicht in der für die Eiweisskörper charakteristischen Weise gefärbt.

4. Fügt man zu dem Filtrat Kalilauge bis zur alkalischen Reaction hinzu und lässt in die Mischung einen Tropfen Kupfersulfatlösung fallen, so entsteht nicht die violette Farbenreaction, welche sonst das Vorhandensein von Eiweisskörpern anzeigt. Eine Probe der mit Wasser verriebenen Substanz mit 1⁰/₀ Sodalösung tropfenweise versetzt, hellt sich sofort vollständig auf, wird also gelöst. Beim Kochen gerinnt diese Lösung nicht, wird aber durch sehr wenig Essigsäure gefällt.

Eine vierte Probe der Substanz mit kohlensaurem Calcium zuerst trocken und dann mit Wasser verrieben, gibt eine sedimentirende, nach längerem Stehenlassen klare Flüssigkeit, welche die Eiweissproben gibt, in welcher sich die Substanz also gelöst hat.

Eine Probe der mit Essigsäure gefällten Substanz mit concentrirter Natriumsulfatlösung fein verrieben liefert eine trübe Mischung, welche klar filtrirt. Im Filtrat ist keine Trübung durch die auch im Überschuss zugefügte Essigsäure zu erzeugen. Die Substanz hat sich in der sauer reagirenden Mischung nicht gelöst. Verreibt man die Substanz mit concentrirter Natriumsulfatlösung und fügt dann Natronhydrat bis zur schwach alkalischen Reaction hinzu, filtrirt und untersucht nun mit Essigsäure, so trübt sich das Filtrat. Die Substanz hat sich also in der alkalisch reagirenden Natriumsulfatlösung gelöst.

Wird die gewaschene und von Essigsäure befreite Substanz mit Kalkwasser fein verrieben und mehrere Stunden stehen gelassen, so löst sich der grösste Theil derselben auf. Durch Versetzen der dekantirten klaren Flüssigkeit mit festem Na_2SO_4 im Überschuss kann die Substanz ausgesalzen werden und

ebenso ist auch durch vorsichtiges Ansäuern mit Essigsäure eine Fällung hervorzubringen.

Vorläufig wollen wir die durch Sättigung mit Natriumsulfat allein sowohl aus der Milch direct als auch aus der nach der früheren Coagulationsmethode von Fett befreiten Milch erzeugte Fällung als Substanz *a*, den in dem Filtrate dieser Substanz durch Essigsäure im Überschuss gefällten Körper als Substanz *b* bezeichnen.

Ist der Niederschlag der Substanz *a* dem Niederschlag der Substanz *b* gleich, ist z. B. der ausgesalzene Stoff *a* ein Caseïnogencalcium und der mit Essigsäure gefällte ein Caseïnogen, welches als Caseïnogennatrium in Lösung war, so ist es möglich, das Caseïnogen durch Versetzen einer Lösung mit $CaCl_2$ ebenfalls in ein Caseïnogencalcium umzuwandeln. Es ist denkbar, dass die Lösung des Caseïnogens durch Zusatz einer löslichen Kalkverbindung in Caseïnogencalcium umgewandelt wird, welches dann auch durch Natriumsulfat allein ausgesalzen werden muss.

Zu dem Zwecke wurden 50 cm^3 Milch mit 150 cm^3 concentrirter Natronsulfatlösung und mit Hühnereiweiss gemischt, bei 100° coagulirt und filtrirt. Das neutralisirte Filtrat wurde in zwei Theile getheilt. Im ersten Theile wurde die Substanz *a* durch festes Glaubersalz, die Substanz *b* im Filtrate derselben durch Essigsäure ausgefällt. In die andere Hälfte wurden 10 *g* einer neutralen 10% Cl_2Ca-Lösung hineingetropft. Die Mischung erzeugt in der Kälte keine Trübung. Wird in dieselbe Na_2SO_4 in Substanz und im Überschuss eingetragen, so werden nach langem Schütteln und Rühren beide Substanzen ausgeschieden. In dem Filtrate des Niederschlags kann weder durch Ansäuern mit Essigsäure (auch im Überschuss) noch mit Metaphosphorsäure, noch mit Kochen nach Neutralisation, noch durch die Farbenreactionen ein Eiweisskörper nachgewiesen werden.

Nach Zusatz des Chlorcalciums sind somit beide Substanzen durch Na_2SO_4 ausgefällt worden, und es ist denkbar, dass die zweite Substanz bei diesem Versuche auch in eine aussalzbare Kalkverbindung übergeführt worden ist.

Sechste Versuchsreihe.

Es ist denkbar, dass bei der Entfernung des Fettes durch Coagulation nach der früher besprochenen Methode nicht blos die coagulirenden Eiweisskörper einschliesslich des Lactalbumins, sondern auch ein Theil des Caseïnogens mit entfernt werden. Um diese Möglichkeit zu prüfen, wurden einerseits in derselben Menge der gleichen Milch sowohl die Substanz *a* als auch die Substanz *b* annähernd der Menge im Coagulationsfiltrat bestimmt, anderseits das Caseogen mit der Hoppe-Seyler'schen Methode in der unveränderten Milch. Es zeigte sich, dass die Summe der annähernd bestimmten Gewichte der Substanzen *a* und *b* gleich ist dem Gewichte der nach Hoppe-Seyler bestimmten Caseogenmenge. Es ist also durch Coaguliren kein Caseïnogen in Verlust gerathen.

Die hierauf bezüglichen Versuche wurden in folgender Weise durchgeführt:

a) Zu 20 cm^3 alkalisch reagirender, fettarmer Kuhmilch wurden 60 cm^3 concentrirter Glaubersalzlösung und 4 cm^3 Hühnereiweiss zugesetzt. Die Flüssigkeit wird bei 100° im Wasserbad coagulirt, heiss filtrirt und dann im kalten Zustande neutralisirt. Nun wird festes Glaubersalz im Überschuss eingetragen. Der durch langes Rühren des Coagulationsfiltrats entstandene Niederschlag der Substanz *a* wird auf dem Filter gesammelt, dann im Wasser gelöst, wieder ausgesalzen, getrocknet und gewogen. Er wiegt 0·47 *g*.

Das Filtrat der Substanz *a* wird mit überschüssiger concentrirter Essigsäure gefällt. Der Niederschlag oder die Substanz *b* wird mit destillirtem Wasser einige Male gewaschen. Er wiegt im trockenen Zustande 0·07 *g*.

b) 20 cm^3 derselben Milch werden mit 380 cm^3 destillirtem Wasser gemischt und unter tropfenweisem Zusatz von verdünnter Essigsäure zur Fällung gebracht. In die Flüssigkeit wird durch eine halbe Stunde Kohlensäure eingeleitet. Der flockige, feine Niederschlag setzt sich nach mehreren Stunden zu grösseren Flocken am Boden des Gefässes zusammen. Derselbe wird auf dem Filter gesammelt, mehrere Male mit absolutem Alkohol und dann sechsmal mit Äther gewaschen, hierauf im Exsiccator getrocknet. Sein Gewicht beträgt 0·55 *g*.

Die Summe aus den Gewichten, und zwar der durch die Aussalzung gewonnenen Substanz *a* und der durch die Fällung ihres Filtrates mit Essigsäure erhaltenen Substanz *b* (zusammen 0·54) ist also annähernd dem Gewichte des durch alleinige Fällung mit Essigsäure aus derselben Milchmenge erhaltenen Caseïnogens (0·55) gleich. Es fragt sich nun, sind die beiden fraglichen Substanzen verschiedene Eiweisskörper (Salze) oder ist in denselben derselbe Eiweisskörper enthalten.

Aus den bisherigen Versuchen kann noch nicht deducirt werden, dass nach dem Zusatze von Kalksalzen zum Coagulationsfiltrat nur ein Eiweisskörper jetzt da sei, und zwar dessen Kalksalz. Es ist möglich, dass die Kalksalze von zweierlei Eiweisskörpern zugegen sind, welche beide durch Natriumsulfat ausgeschieden werden können.

Zunächst wollen wir noch im Nachfolgenden die Eigenschaften der Substanzen *a* und *b* anführen:

Die Substanz *a* löst sich sehr leicht im Wasser, in wässerigen Lösungen der Alkalien und im Kalkwasser, in verdünnten Lösungen der Neutralsalze, in wässerigen Lösungen der Carbonate der Alkalien und im Kalkwasser. Aus diesen Lösungen wird sie mit verdünnter Essigsäure in der Kälte leicht gefällt. In diesem Zustande löst sie sich nicht mehr im Wasser, in verdünnter wässerigen Lösungen der Neutralsalze und in concentrirter Essigsäure, aber leicht in 1 $^0/_0$ Lösungen der Alkalien und ihrer Carbonate und im Kalkwasser. Aus ihren neutralen Lösungen wird sie mit festem Natriumsulfat gefällt. Ihre Lösungen geben bei der Biuretprobe und bei der Untersuchung mit dem Millon'schen Reagens die für die Eiweissstoffe charakteristischen Farbenreactionen. Ihre Lösungen gerinnen in der Siedehitze nicht.

Die mit Essigsäure gefällte Substanz *b* löst sich nicht im Wasser, in Lösungen der Neutralsalze und in concentrirter Essigsäure, sie löst sich aber in Lösungen der Alkalien, im Kalkwasser und in Lösungen der Carbonate der Alkalien. In diesen Lösungen erzeugt die Essigsäure nur eine geringe Trübung.

Die Lösungen der Substanz *b* geben die Farbenreaction des Millon'schen Reagens und der Biuretprobe. Aus ihrer

ursprünglichen Lösung in concentrirter Natriumsulfatsolution (Filtrat der Substanz *a*) wird sie durch ClNa oder durch $MgSO_4$ gefällt. Im ausgesalzenen Zustande löst sie sich leicht im Wasser und lässt sich wieder aussalzen oder mit überschüssiger Essigsäure fällen.

Zur Charakterisirung der Substanzen *a* und *b* wurden noch folgende Versuche gemacht:

a) Das klare, nach der angeführten Methode bereitete Coagulationsfiltrat wird tropfenweise mit sehr verdünnter Essigsäure bis zur Erscheinung einer deutlichen, flockigen Trübung versetzt. In dem wasserklaren Filtrat dieser Flocken bringt überschüssige, concentrirte Essigsäure, von welcher eine verhältnissmässig sehr grosse Menge genommen werden muss, nochmals einen Niederschlag hervor. Das Filtrat des letztgenannten Niederschlags trübt sich beim Kochen nicht mehr. Das Millon'sche Reagens und die Biuretprobe rufen in demselben nicht die für die Eiweisskörper charakterischen Farben hervor, auch die Metaphosphorsäure keine Fällung. Die Eiweissproben fallen auch dann negativ aus, wenn das Filtrat vor der Untersuchung mittelst Natronhydrat neutralisirt wird.

b) Eine Probe desselben Filtrats wird sofort mit überschüssiger Essigsäure versetzt, die entstandenen Flocken werden abfiltrirt, das klare Filtrat wird zum Sieden gebracht, es trübt sich nicht. Die Millon'sche und die Biuretreaction treten bei dem Filtrat nicht ein. Dieselben Eiweissproben fallen in dem früher neutralisirten Filtrat auch negativ aus.

c) Der durch tropfenweises Ansäuern des Coagulationsfiltrats gewonnene Niederschlag wird durch Filtration von der Flüssigkeit getrennt. Die Flüssigkeit wird mit Natronhydrat neutralisirt und mit überschüssigem Bittersalz gemischt. Eine deutliche Fällung tritt binnen einigen Minuten auf. Die Aussalzung eines Eiweissstoffes gelingt auch mit dem Steinsalz. Die Filtrate der ausgesalzenen Niederschläge sind eiweissfrei.

Fasst man die letzten drei Versuche zusammen, so ergibt sich aus denselben:

1. In der vom Lactalbumin (und Globulin) und Fett befreiten Milch fällt die im Überschuss zugesetzte Essigsäure sowohl die Eiweisssubstanz *a*, als auch die Substanz *b* vollständig.

2. In derselben Milch wird durch sehr schwaches Ansäuern die Substanz *a* gefällt; die Substanz *b* kann in dem Filtrate der Substanz *a* durch überschüssige Essigsäure gefällt werden. Durch Sättigung mit Magnesiumsulfat und mit Chlornatrium wird auch die Substanz *b* ausgeschieden, aber in Salzform (wahrscheinlich als Na- oder K-Salz).

Siebente Versuchsreihe.

Nun wurden noch beide Substanzen auf Phosphor und Calcium untersucht.

Die Phosphorbestimmung geschah nach der bekannten Methode mit dem molybdänsauren Ammon. Die Phosphorreaction beider isolirten und wiederholt gewaschenen Substanzen unterschied sich nicht von der Phosphorreaction des Hoppe-Seyler'schen Caseïns. Die Menge des Niederschlages in den Proben der Substanz *a* und *b* ist anscheinend so gross wie in der gleichgrossen Probe des nach Hoppe-Seyler dargestellten Caseïns.

Soweit es sich bei den qualitativen Analysen feststellen lässt, enthalten sowohl die Substanz *a*, als auch die Substanz *b* den Phosphor in denselben schätzenswerthen Mengen.

Vor der Untersuchung der Substanz *a* auf Kalk wurde dieselbe früher mit concentrirter Glaubersalzlösung wiederholt gewaschen, getrocknet und mit der aus kohlensaurem Natron und Natronsalpeter bestehenden Mischung geglüht. Das Resultat der Untersuchung war ein positives. Wurde eine Probe der ausgesalzenen Substanz *a* hierauf im Wasser gelöst, mit Essigsäure gefällt, gesammelt, getrocknet und weiterhin nach Einhaltung desselben Ganges der Untersuchung auf Ca geprüft, so zeigte sie sich calciumfrei. Offenbar ist die Substanz *a* ganz oder zum Theil als Kalksalz ausgesalzen worden, und aus der wässerigen Lösung des Kalksalzes wurde der Eiweisskörper der Substanz durch die Essigsäure kalkfrei gefällt.

In der nach dem obigen Verfahren dargestellten Substanz *b* (Ausfällen des Filtrats *a* mit überschüssiger Essigsäure) wurde kein Kalk gefunden. Auch dann, wenn die Substanz *b* mit Chlornatrium, bezüglich mit Magnesiumsulfat

in Salzform ausgesalzen worden ist, war das entsprechende Salz der Substanz *b* kalkfrei. Hieraus muss geschlossen werden, dass das in Lösung vorhandene Salz der Substanz *b* kein Kalksalz, sondern wahrscheinlich ein Na- oder K-Salz ist.

Es ist zu bemerken, dass bei den Phosphor- und Calciumanalysen die in dem Milchfiltrat gelösten phosphorsauren Salze und Kalkverbindungen durch wiederholtes Waschen der Substanzen völlig eliminirt wurden. Da Controlproben stets sorgfältig ausgeführt wurden, so kommen hiebei Untersuchungsfehler nicht in Betracht.

Achte Versuchsreihe.

Verhalten der beiden Eiweisssubstanzen *a* und *b* zum Lab.

Werden einer Probe des neutralisirten Coagulationsfiltrats der Milch einige Tropfen 10% Chlorcalciumlösung und dann eine Spur Glycerinlabextract zugesetzt und wird die Flüssigkeit auf 40° C. erwärmt, so bilden sich in derselben nach 2 bis 5 Minuten reichliche Flocken. Das Milchfiltrat enthält somit Caseïnogen.

Der nach der genannten Methode erhaltene Niederschlag der Substanz *a* wird in destillirtem Wasser aufgelöst und mit einem Tropfen Labextract versetzt. Nach einigen Minuten stellt sich in der Lösung schon in der Kälte, deutlicher aber bei schwacher Erwärmung im Wasserbade eine flockige Trübung ein. Die ausgesalzene Eiweisssubstanz *a* besitzt somit den Charakter eines Caseïnogens.

Die aus dem Filtrate der Substanz *a* mit Essigsäure gefällte Substanz *b* wird mit Wasser gewaschen und in 1% Sodalösung gelöst. Die klare aber schwach opalisirende alkalische Lösung wird nach vorsichtigem Neutralisiren mit einigen Tropfen Chlorcalciumlösung und mit einem Tropfen Labextract versetzt. Nach 2—5 Minuten trübt sich die auf 44° C. erwärmte Flüssigkeit sehr schwach, aber doch merklich. Die Substanz *b* verhält sich also dem Lab gegenüber anders als die Substanz *a*. Dies ergibt sich aus den nachfolgenden Versuchen.

Die Substanz *a* wird im Wasser gelöst und mit Essigsäure wieder ausgefällt und gesammelt. Werden nun gleiche Proben beider Substanzen mit Kalkwasser behandelt, so gibt die Substanz *a* eine ganz klare, die Substanz *b* eine opalisirende Lösung. Werden weiters beide Lösungen vorsichtig neutralisirt und mit je einem Tropfen Labextract versetzt, so erscheint nach dem Erwärmen auf 40° C. in der Lösung der Substanz *a* ein flockiger Niederschlag, die Lösung der Substanz *b* trübt sich hingegen nur sehr schwach.

Wird eine Probe der Lösung der Substanz *a* mit Essigsäure angesäuert, so erhält man einen reichlichen flockigen Niederschlag, während die Probe der Lösung der Substanz *b* sich nach Essigsäurezusatz nur schwach trübt.

Der Schluss aus all' diesen Versuchen ist dieser: in der mit der dreifachen Menge Natriumsulfatlösung und mit etwas Eiweiss versetzten und durch Coagulation von ihrem Fett und von Lactalbumin (und Globulin) vollständig befreiten Kuhmilch sind zwei Eiweisssubstanzen gelöst enthalten. Die eine oder die Substanz *a* ist durch das Natriumsulfat in Salzform ausscheidbar, die andere oder die Substanz *b* bleibt in dem Filtrate der Substanz *a* gelöst und ist durch die Essigsäure in der Kälte fällbar. Die Substanz *a* besitzt ähnliche Eigenschaften wie das Caseïnogen. Die Substanz *b* differirt in ihren Eigenschaften vom ursprünglichen Caseïnogen. Ihre Natur ist noch nicht erforscht.

Neunte Versuchsreihe.

Versuche mit reiner Milch.

Hat die in der mit der dreifachen Menge der gesättigten Glaubersalzlösung und mit etwas Hühnereiweiss gemischten Milch bewirkte Coagulation nur die Bedeutung, das Fett, einen für die chemische Untersuchung störend wirkenden Bestandtheil, völlig zu beseitigen, ohne die chemische Zusammensetzung der Milch, insbesonders ohne die Natur ihrer Eiweisskörper zu verändern, so muss in der auf andere Weise möglichst fettfrei gemachten Milch der Nachweis beider Proteïnarten *a* und *b* durch die Aussalzung mit Natriumsulfat und durch die Fällung des Filtrates mit Essigsäure auch möglich sein.

Die zu diesen Versuchen verwendete Magermilch musste aus dem Handel bezogen werden. Sie enthielt, nach der optischen Methode Feser's geprüft, noch 1—2% Fett. Nach 12- bis 24stündigem Aufrahmen betrug die Fettmenge derselben noch immer circa 0·25%. Diese Percentzahl wurde durch nachheriges Centrifugiren noch erheblich vermindert.

40 cm^3 der fettarm gemachten, schwach alkalisch reagirenden Milch (deren Reaction mit dem neutralen Lackmuspapier geprüft wurde) wurden mit Glaubersalz im Überschuss versetzt und stundenlang gerührt, über Nacht stehen gelassen und wieder gerührt. Eine Fällung trat in dieser Milch erst nach dieser langen Dauer ein. Ihre Reaction änderte sich hiebei nicht.

Eine zweite Probe käuflicher Magermilch, welche versuchsweise nicht entrahmt wurde, liess nach dem Zusatze von überschüssigem Natriumsulfat und sehr langem Schütteln und Rühren nur eine schwache Fällung wahrnehmen. Aufs Filter gebracht tropfte von der Mischung ein getrübtes Filtrat ab, die Filtration hörte bald ganz auf. In der eingedickten Masse auf dem Filter entstanden bald zahlreiche kleine Krystalle des ausgeschiedenen Salzes. Ebenso misslang ein dritter und vierter Versuch, welcher in gleicher Weise mit derselben Milch vorgenommen wurde. Es war nicht möglich, aus der Milch einen festen Niederschlag und ein klares Filtrat zu erhalten.

In der Meinung, die käufliche Milch enthalte irgend einen künstlichen Zusatz, welcher die Aussalzung hindert, entnahm ich die Milch einer gesunden, für die Institutszwecke angekauften Kuh. Ohne die Aufrahmung ganz abzuwarten, trug ich in diese Milch das Glaubersalz im Überschuss ein. Eine Aussalzung trat auf langes Rühren der Mischung auch in dieser Milch nicht ein.

Dieses Verhalten stand im Widerspruch zu den früher erwähnten Versuchen, welche ein zufriedenstellendes Resultat ergaben. Die Verschiedenheit des specifischen Gewichtes der zu den Versuchen verwendeten Milchsorten konnte nicht von Einfluss auf die Aussalzung gewesen sein, denn wurden die specifischen Gewichte durch Zugabe von destillirtem Wasser gleichgestellt oder mehr oder weniger verändert, so übte das keinen Einfluss auf die Aussalzung aus.

Zum Schlusse wurden die Milchproben, um zum Ziele zu gelangen, durch 24stündiges Aufrahmenlassen und durch nachheriges Centrifugiren möglichst gut entfettet. Die Aussalzung gelang hierauf in kürzester Zeit vollkommen. Nach dem Eintragen des Magnesiumsulfats und nach kurzem Mischen nahm die Milch eine dickliche Consistenz an. Brachte man die Masse auf das Filter, so tropfte ein wasserklares Filtrat bis zum Trockenwerden des Niederschlages ab.

Wie ich mich später noch durch andere Versuche belehrte, gibt stets das unvollständig entfernte Fett das Hinderniss für die Aussalzung der Milch mit dem Natriumsulfat ab, denn ist der Fettgehalt ein geringer und übersteigt er nicht ungefähr 0·25%, so gelingt die Aussalzung zwar langsam, aber immer.

Der nach Analogie der früheren Versuche aus Caseïnogencalcium und Fett bestehende Niederschlag *a* wird auf dem Filter mehrere Male mit Alkohol, hierauf mit Äther gewaschen, getrocknet und gewogen. Das Gewicht des aus 20 cm^3 Milch ausgesalzenen Niederschlages der Substanz *a* beträgt 0·65 *g*. Dasselbe ist somit gegenüber den Analysen des Coagulationsfiltrats etwas grösser und ist durch Salzgehalt des Niederschlages zu erklären. Um daher das wirkliche Gewicht der Substanz *a* durch Eliminirung der eingeschlossenen Krystalle zu erfahren, wird der Niederschlag im Wasser gelöst, mit Essigsäure gefällt, auf dem Filter gesammelt und wiederholt mit Wasser gewaschen. Das Gewicht reducirt sich dann auf circa 0·57 *g*, also annähernd auf dieselbe Zahl, die sich aus den früheren Analysen derselben Milch ergeben hat.

Das Filtrat des Niederschlages der Substanz *a* (welcher durch die Aussalzung der Milch mit Na_2SO_4 erhalten wurde) fällte ich mit überschüssiger concentrirter Essigsäure und filtrirte es dann. Der auf die Art gewonnene Niederschlag der Substanz *a* wiegt, nachdem er öfter mit Wasser gewaschen und schliesslich getrocknet wurde, 0·07 *g*. Also es wurde wieder dieselbe Menge der Substanz *b* gefunden wie bei den früheren Analysen derselben Milch. Auch hier muss die grosse zur Ausscheidung der Substanz *b* nöthige Essigsäuremenge besonders hervorgehoben werden.

Das Filtrat der Substanz *b*, welches völlig klar war, erwies sich nicht frei von einer weiteren Eiweisssubstanz. Durch weiteren Essigsäurezusatz war zwar in demselben keine Veränderung in der Kälte hervorzurufen, aber es trübte sich beim Kochen sehr auffallend und gab auch alle anderen Eiweissproben. Diese Substanz ist das Lactalbumin (und Lactoglobulin).

Die beiden Eiweisssubstanzen, welche aus der reinen Kuhmilch theils durch Aussalzung mit dem Natriumsulfat, theils durch Essigsäurefällung gewonnen wurden und welche beide phosphorhältig sind, zeigen auch in ihrem Verhalten zum Lab dieselben Erscheinungen wie die analogen Eiweisskörper, welche aus dem Coagulationsfiltrat der Milch dargestellt worden sind. Es ist daher kein Grund vorhanden, sie für etwas anderes zu halten.

Die Substanz *a* ist kalkhältig, die Substanz *b* (im ausgesalzenen Zustande) kalkfrei.

Das Erscheinen einer dritten Substanz im Filtrate der aus der reinen Kuhmilch gefällten Substanz *b* steht nicht im Widerspruche zu den früheren Versuchen. Diese dritte Substanz, welche dem Lactalbumin der Autoren (und dem Globulin Seb.) entspricht, wurde bei der Coagulation der Milch mit dem Hühnereiweiss und Fett zugleich ausgeschieden und durch die Filtration entfernt. In dem Filtrate der Substanz *b* konnte daher kein weiterer Eiweisskörper in Lösung bleiben.

Das Natriumsulfat ruft somit in der reinen Milch geradeso die Aussalzung der Substanz *a* hervor, wie in der nach der angeführten Methode coagulirten, und ebenso fällt auch hier überschüssige Essigsäure die Substanz *b* aus dem Filtrate der Substanz *a* vollständig. Nur ist bei der Anwendung der unveränderten Milch im Filtrate der Substanz *b* noch das Lactalbumin enthalten.

Zehnte Versuchsreihe.

Um mehrere Anhaltspunkte für den Vergleich der aus dem öfter erwähnten Coagulationsfiltrat dargestellten Körper mit

denen, welche aus der unveränderten Milch gewonnen wurden, zu bekommen, wurde bei genau denselben Proben der Flüssigkeiten auch immer genau die Menge der zur Fällung nothwendigen Essigsäure (es ist die gleiche bei allen Reactionen angewendet worden) gemessen, und zwar sowohl bei Anwendung unseres Filtrates, als auch bei unveränderter Milch.

Als Beispiele sollen einige Versuche erwähnt werden.

1. 15 cm^3 Milch werden mit 45 cm^3 concentrirter Glaubersalzlösung und mit 3 cm^3 Hühnereiweiss gemischt und bei 100° C. coagulirt. Das neutralisirte Filtrat wird in zwei Theile getheilt. Der erste Theil wird mit drei Tropfen concentrirter Essigsäure versetzt. Eine starke flockige Fällung tritt auf. Im klaren Filtrate derselben erzeugen 8 cm^3 concentrirter Essigsäure wieder eine Fällung. Das Filtrat dieses Niederschlages erweist sich bei der Vornahme verschiedener Eiweissproben als eiweissfrei. Der andere Theil des Coagulationsfiltrats wird mit Natriumsulfat in Substanz ausgesalzen und das Filtrat der auf die Art erhaltenen Substanz *b* mit 8 cm^3 Essigsäure gefällt. Das Filtrat der Substanz *b* ist eiweissfrei.

2. 15 cm^3 Milch werden mit 45 cm^3 concentrirter Glaubersalzlösung gemischt. Nach dem Zusatze von 3—5 Tropfen concentrirter Essigsäure tritt in der Flüssigkeit eine grossflockige Fällung *(a)* auf. In dem Filtrate ist durch 8 cm^3 Essigsäure keine Fällung zu bewirken, auch durch weiteren Essigsäurezusatz nicht. Wird aber das letztgenannte Filtrat nachträglich mit dem Natriumsulfat gesättigt, so scheidet sich sehr langsam ein Niederschlag aus. Versetzt man das Filtrat des Niederschlages *(a)* zuerst mit festem Natriumsulfat (bis zur Sättigung) und dann erst mit 8 cm^3 Essigsäure, so scheidet sich dieselbe Menge des Niederschlages *b* aus. In beiden Fällen trübt sich das Filtrat des Niederschlages *b* beim Kochen und gibt auch die gewöhnlichen Eiweissproben. Es enthält somit noch das Lactalbumin.

Nach der Abscheidung der Substanz *a* ist somit im Filtrate derselben noch ein Eiweisskörper enthalten, der sich aber dadurch von dem analogen des Coagulationsfiltrats unterscheidet, dass er erst aus mit Natriumsulfat gesättigter Lösung durch überschüssige Essigsäure gefällt wird.

3. Endlich wurde in reiner Milch bei Vermeidung der Anwendung von Natriumsulfat von vornherein die Ausfällung der Eiweisskörper mit Essigsäure versucht:

15 cm^3 Milch wurden mit 45 cm^3 Wasser gemischt. Auf Zusatz von 3—5 Tropfen concentrirter Essigsäure entsteht in der Flüssigkeit ein grobflockiger Niederschlag. Das klare Filtrat des Niederschlages wird durch überschüssige Essigsäure nicht gefällt. Wird der Versuch wiederholt und das Filtrat des mit wenig Essigsäure erhaltenen Niederschlages zunächst mit Natriumsulfat gesättigt, so entsteht nach längerer Zeit eine schwache Fällung. Im Filtrate dieses Niederschlages ruft überschüssige Essigsäure (etwa 8 cm^3) nochmals eine Fällung hervor.

Der Versuch zeigt, dass durch die Essigsäure das ursprüngliche Caseïnogen gefällt wird, aber nicht vollständig. Der im Filtrat enthaltene Rest des Caseïnogens wird durch die Natriumsulfatwirkung gespalten in die Substanzen *a* und *b*.

Schlussbemerkungen zu den Glaubersalzversuchen.

Wir kommen nun zur Erörterung der Frage, ob die beiden Substanzen *a* und *b* als solche unverbunden sind oder ob sie bei Anwendung von Natriumsulfat in der oben besprochenen Weise durch Spaltung des ursprünglichen Caseïnogens der Milch entstanden sind.

Diese Frage wird beantwortet durch den Versuch, bei welchem durch wenig Essigsäure aus der nur mit Wasser verdünnten Milch der grösste Theil des Caseïnogens gefällt worden ist und in dessen Filtrat durch Aussalzen nur mehr wenig vom Körper *a* und *b* gefunden worden ist.

Es muss geschlossen werden, dass die Substanzen *a* und *b* zum ursprünglichen Caseïnogen chemisch verbunden sind, weil beide Substanzen nicht gleichzeitig durch wenig Essigsäure gefällt werden, sondern dass es nur bei der Substanz *a* der Fall ist, während *b* aus der reinen wässerigen Lösung überhaupt durch die Essigsäure schlecht gefällt wird. Wenn man an ein Mitreissen der Substanz *b* bei Zusatz von wenig Essigsäure denken würde, so würde das schon an und für sich auf eine innigere Beziehung von *a* und *b* hinweisen, d. i. auf eine chemische Verbindung.

Aus allen Versuchen muss daher der Schluss gezogen werden, dass neben dem Lactalbumin (und Sebelien's Globulin) nur ein einziges Caseïnogen in der Milch da ist. Dieses Caseïnogen wird durch Natriumsulfat in grösserer Menge in zwei Substanzen gespalten, und zwar in die früher beschriebenen Substanzen *a* und *b*.

Die Frage ist noch nicht entschieden, ob allein schon durch den Zusatz von drei Volumtheilen gesättigter Natriumsulfatlösung die Spaltung bewirkt wird, oder erst dann, wenn durch Sättigung mit Natriumsulfat oder durch Zusatz von Essigsäure die Fällung erfolgt ist.

II. Versuche mit Magnesiumsulfat.

Erste Versuchsreihe.

Dass das Caseïnogen der Milch durch das Magnesiumsulfat zur Ausscheidung gebracht werden kann, ist längst bekannt. Hoppe-Seyler und Tolmatscheff bedienten sich schon der Methode zur Darstellung des Caseïns. Welchen Eiweisskörper jedoch das Filtrat dieses Caseïns noch überhaupt gelöst enthält, ist noch nicht sicher entschieden. Arthus (Arch. de physiol., 25) erhielt beim Erhitzen des Filtrats von dem mit Magnesiumsulfat, Chlornatrium, Essigsäure etc. erhaltenen Caseïn ein Coagulum, welches in Fluornatrium unlöslich war, also nicht aus Caseïn bestand. Er hält diesen Körper für Lactoglobulin und Lactalbumin.

Halliburton fällt die Milch mit Magnesiumsulfat so vollständig, dass in der Molke nur das Lactalbumin zurückbleibt. Neben dem Caseïn und Lactalbumin vertheidigt die Existenz des Lactoglobulins auch Sebelien (l. c.).

Die folgenden Untersuchungen der Milch mit dem Magnesiumsulfat geschahen in ähnlicher Weise wie die Untersuchungen mit Natriumsulfat.

Das zu den Versuchen verwendete Magnesiumsulfat wurde durch Abdampfung einer concentrirten Lösung bei 50° C. dargestellt. Die concentrirte Lösung enthält gleiche Theile von Salz und Wasser und wird durch langsames Abdunsten der Flüssigkeit bis zur Krystallbildung erhalten.

Das Bittersalz wurde der Milch theils in Substanz und im Überschuss, theils in gesättigter Lösung zugesetzt. Um die Concentrationsgrenze, bei welcher die Milch von der Bittersalzlösung gefällt wird, festzustellen, wurde die Lösung einer gemessenen Milchmenge mittelst der Bürette von 0·5 cm^3 zu 0·5 cm^3 zugetropft. Wie bei den Glaubersalzversuchen wurde auch hier der Eintritt der Fällung bei der Zimmertemperatur, d. i. bei 18—20° C., dann bei 50° C. und endlich bei 100° C. bestimmt.

Wird die Kuhmilch mit Magnesiumsulfat (durch Eintragen des Salzes in Substanz und im Überschuss) gesättigt, so wird sie sehr rasch (nach wenigen Minuten) gefällt, indem sie sich in eine rahmartige, dickliche Masse umwandelt. Aufs Filter gebracht, fliesst von dem Niederschlag ein wasserklares Filtrat langsam ab. Das Filtrat gerinnt beim Kochen und trübt sich auf Essigsäurezusatz in der Kälte.

In der Kälte erfolgt auf Zusatz von:

8 cm^3 Lösung zu	2 cm^3 Milch	Fällung.
7 cm^3	3 cm^3	
6 cm^3	4 cm^3	
5 cm^3	5 cm^3	keine Fällung.
4 cm^3	6 cm^3	

Bei 50° C. geben:

8 cm^3 Lösung und	2 cm^3 Milch	Fällung.
7 cm^3	3 cm^3	
6 cm^3	4 cm^3	
5 cm^3	5 cm^3	
4 cm^3	6 cm^3	
3 cm^3	7 cm^3	keine Fällung.
2 cm^3	8 cm^3	

Bei der Siedetemperatur, d. i. bei 100° C., fällt noch 1 Theil der Lösung 8 Theile Milch.

Das Bittersalz besitzt somit für die Milch ein viel stärkeres Fällungsvermögen als das Glaubersalz. In der Kälte fällen 6 Theile Bittersalzlösung 4 Volumtheile Milch, während die

Milch von der concentrirten Glaubersalzlösung in keinem Mischungsverhältniss in der Kälte gefällt wird.

Bei der Temperatur von 50° C. werden 6 Theile Milch noch von 4 Theilen Bittersalzlösung gefällt. Dem gegenüber fällt die Natriumsulfatlösung die Milch bei 50° C. erst bei dem Verhältniss von 1 Theil Milch zu 20 Theilen Lösung.

Bei der Siedetemperatur fällt 1 Theil Magnesiumsulfatlösung 8 Theile Milch, die Natriumsulfatlösung aber nur 1 Theil Milch. In der Siedehitze ist somit das Fällungsvermögen der Bittersalzlösung ungefähr achtmal so gross als jenes der Glaubersalzlösung.

Zweite Versuchsreihe.

Zur Beantwortung der Frage, ob die mit der concentrirten Bittersalzlösung und mit Hühnereiweiss gemischte und dann bei 100° C. coagulirte Milch auch noch eine aussalzbare und eine im Filtrate der ausgesalzen mittelst Essigsäure fällbare Eiweisssubstanz enthält, wurden die mit dem Natriumsulfat angestellten Versuche hier wiederholt.

1. 30 Theile Magermilch werden mit 30 Theilen Magnesiumsulfatlösung und mit einigen Tropfen Eiweiss gemengt und bei 100° C. coagulirt. Eine sehr starke Gerinnung tritt auf. Gibt man die Masse auf das Filter, so tropft langsam ein trübes Filtrat ab. Das Filtriren hört nach einigen Minuten ganz auf. Der Versuch ist somit misslungen.

2. 50 Theile Milch werden mit 25 Theilen Bittersalzlösung und mit etwas Hühnereiweiss gemischt und bei 100° C. coagulirt und filtrirt. Das Filtrat ist wieder trüb. Ebenso geben 6 Theile Milch und 4 Theile Lösung, sowie 7 Theile Milch und 3 Theile Lösung ein schlechtes Resultat. Bei dem Verhältnisse von 8 Theilen Milch und 2 Theilen Lösung entsteht zwar ein reines, klares Coagulationsfiltrat, neutralisirt man jedoch dasselbe und versetzt es mit überschüssigem Bittersalz, so werden nur minimale Mengen der Substanz *a* ausgeschieden.

Offenbar ist bei der genannten Concentration der grösste Theil des Caseïns durch das Coaguliren und Filtriren entfernt worden, so dass nur ein kleiner Theil desselben im Filtrate gelöst blieb. Wurde das Mischungsverhältniss von Lösung und

Milch nach der einen oder anderen Seite abgeändert, so war entweder das Coagulationsfiltrat trüb, oder in demselben war durch Aussalzung keine Eiweisssubstanz zu erhalten. Das Bittersalz weicht somit auch in dieser Hinsicht von dem Glaubersalz ab und eignet sich in der angeführten Art nicht zur Wiederholung der Glaubersalzversuche.

Dritte Versuchsreihe.

In glaubersalzhältiger Milch findet jedoch durch das Magnesiumsulfat eine Trennung der beiden Eiweissstoffe in demselben quantitativen Verhältnisse, wie es durch die Sättigung der Milch mit Glaubersalz geschieht, statt. Dies ergibt sich aus dem nachfolgenden Versuche:

20 cm^3 Milch werden nach der früher angeführten Methode coagulirt und filtrirt In das neutralisirte, klare Filtrat wird Bittersalz im Überschuss eingetragen. Nach langem Mischen scheidet sich ein feinflockiger Niederschlag *a* aus. Das Filtrat dieses Niederschlags gerinnt beim Kochen und wird von überschüssiger Essigsäure in der Kälte gefällt. Die zur vollständigen Fällung nöthige Menge Essigsäure ist eine sehr grosse. Im Filtrate der mit Essigsäure gefällten Substanz *b* ist kein Eiweisskörper mehr enthalten.

Zur Bestimmung des quantitativen Verhältnisses der Substanzen *a* und *b* wird der Versuch wiederholt, so zwar, dass das ganze Filtrat der ausgesalzenen Substanz *a* mit Essigsäure gefällt wird.

Der Niederschlag *a*, welcher zahlreiche kleine Krystalle einschliesst, wird im Wasser gelöst, mit Essigsäure gefällt, mit Wasser gewaschen und gewogen. Sein Gewicht ist 0·50 *g* (gegenüber 0·47 *g* der Glaubersalzversuche). Der mit Wasser gewaschene und getrocknete Niederschlag *b* wiegt 0·08 *g* (gegenüber 0·07 *g* der Glaubersalzversuche).

Die quantitativen Verhältnisse der Substanzen *a* und *b* nach der gegenwärtigen Analyse stimmen also annähernd mit jenen der Glaubersalzversuche überein. Die Übereinstimmung ist auch in Hinsicht auf das Verhalten zum Lab und in Hinsicht auf den Phosphorgehalt vorhanden, und man ist wohl berechtigt,

den Schluss zu ziehen, dass in dem Coagulationsfiltrat der Milch sich die Substanz *a* von der Substanz *b* durch das Bittersalz gerade so trennen lässt, wie durch das Glaubersalz.

Vierte Versuchsreihe.

Dass das Bittersalz in der reinen, durch Aufrahmung oder durch das Centrifugiren von Fett möglichst befreiten Milch die Ausscheidung eines der beiden besprochenen Eiweisskörper auch hervorrüft, weisen die nachfolgenden Versuche nach:

40 cm^3 Magermilch (schwach alkalische Reaction, spec. Gewicht 1·035, Fettgehalt 0·25 $^0/_0$) werden mit festem Magnesiumsulfat im Überschuss versetzt und einige Minuten gerührt. Die Milch verwandelt sich in eine dickliche, syrupartige Masse. Die Aussalzung ist erfolgt. Aufs Filter gebracht, tropft von dem Niederschlag *a* ein klares Filtrat ab.

Der Niederschlag *a* wird in einer Reibschale mit absolutem Alkohol verrührt, filtrirt und zur Befreiung von Fett mehrere Male hintereinander mit Äther gewaschen.

Der trockene Niederschlag *a*, welcher ein weisses, staubfeines Pulver darstellt und der Substanz *a* der früheren Versuche entspricht, wiegt sammt zahlreichen eingeschlossenen Krystallen 1·63 *g*. Wird er in destillirtem Wasser gelöst, mit Essigsäure ausgefällt, mit Wasser gewaschen, gesammelt und getrocknet, so verringert sich sein Gewicht bis zu 1 128 *g* (pro 20 cm^3 Milch 0·56 *g*), also bis zu einer Zahl, welche das Gewicht der mit Glaubersalz gefällten Substanz *a* nicht sehr erheblich übersteigt (0·47 *g*).

Das Filtrat der Substanz *a* trübt sich beim Kochen und wird von einer grossen Menge Essigsäure in der Kälte gefällt. Der gesammelte, mit Essigsäure hervorgerufene Niederschlag oder die Substanz *b* mit Wasser gewaschen und dann im Exsiccator getrocknet, wiegt 0·10 *g* (gegenüber von 0·08 *g* bei den Glaubersalzversuchen). Eine Probe des Niederschlags löst sich im Wasser nicht, aber sofort in 1 $^0/_0$ Natroncarbonatlösung. In dieser Lösung gerinnt er nicht beim Kochen.

Das Filtrat der Substanz *b* trübt sich nicht auf weiteren Zusatz von Essigsäure, gibt jedoch beim Kochen eine deutliche

Trübung. Es enthält somit noch einen Eiweisskörper gelöst. Auf einen Eiweisskörper in dem Filtrate der Substanz *b* weisen auch mehrere Eiweissproben, wie das Millon'sche Reagens, die Biuretprobe, die Xanthoproteïnprobe etc. hin. Dieser Eiweisskörper ist das Lactalbumin (und Sebelien's Lactoglobulin).

Bei der coagulirten Milch konnte das Lactalbumin (und Globulin) nicht in dem Filtrate der Substanz *b* erscheinen, weil es durch die Coagulation und Filtration mit dem Hühnereiweiss und Fett zusammen entfernt worden ist.

Beide Eiweissstoffe enthalten Phosphor, die Substanz *a* auch Calcium. Ihr Verhalten zum Lab ist nicht das gleiche.

Die Substanz *a* gerinnt in neutraler Lösung auf Labzusatz. Werden dem Filtrate der Substanz *a* einige Tropfen 1% Chlorcalciumlösung und dann ein Tropfen Glycerinlabextract zugefügt, so ist in der auf 44° C. erwärmten Flüssigkeit nur eine äusserst schwache Trübung wahrzunehmen, obwohl durch Essigsäure allein eine deutliche Fällung und beim Erwärmen einer Probe auf 100° C. eine deutliche Coagulation eintritt.

Man könnte wohl annehmen, dass das Magnesiumsulfat die Ausscheidung des Albuminstoffes durch Lab hindert. Fällt man aber das Filtrat der Substanz *a* mit Essigsäure und eliminirt auf die Art das Bittersalz, löst die Substanz *b* in kohlensaurer Natronlösung, neutralisirt und untersucht wieder mit Lab, so ist der Erfolg kein besserer.

Bei den Glaubersalzversuchen ist die Ausscheidung der Substanz *a* aus einer ursprünglich stark alkalischen und dann erst neutralisirten Flüssigkeit erfolgt. Um daher dem Einwande zu begegnen, dass die Milch selbst gewöhnlich schwach alkalisch reagirt und daher unter den Versuchen keine Analogie hinsichtlich der chemischen Reaction der Flüssigkeiten herrscht, wurde die Milch vor der Aussalzung mit Magnesiumsulfat neutralisirt. Das quantitative Verhältniss der beiden in der angegebenen Weise gewonnenen Eiweissstoffe erfuhr dadurch keine Änderung. Die beiden Substanzen verriethen auch keine Änderung in ihren chemischen Eigenschaften.

Damit zwischen den Versuchen mit dem so oft schon angeführten Coagulationsfiltrat und der reinen Milch eine Analogie ist, wurde die Milch vor dem Eintragen des Bittersalzes mit der dreifachen Menge gesättigter Glaubersalzlösung versetzt. Dies änderte jedoch keineswegs die Untersuchungsresultate.

Aus Allem folgt, dass das Bittersalz in der reinen Milch dieselbe Ausscheidung hervorruft, wie in dem Coagulationsfiltrat und dass die durch dasselbe getrennten Eiweisskörper dieselben Eigenschaften besitzen, wie die durch das Glaubersalz isolirten.

III. Versuche mit Chlornatrium.

Erste Versuchsreihe.

Wie bei den früheren Versuchen wurde auch hier zur Prüfung der Kuhmilch das Steinsalz theils in Substanz, theils in gesättigter Lösung verwendet.

Zur Darstellung der gesättigten Chlornatriumlösung wurden 33 Theile Steinsalz mit 100 Theilen Wasser gemengt, auf 50° erwärmt und zum Abdunsten gebracht.

Wird die Kuhmilch mit festem Chlornatrium im Überschuss versetzt, so tritt nach längerem Rühren und nach eingetretener Sättigung in der Kälte Fällung auf. Die Milch nimmt hiebei eine syrupartige Consistenz an. Gibt man die Masse aufs Filter, so tropft langsam ein wasserklares, etwas grünlichgelb gefärbtes Filtrat ab. Versetzt man das Filtrat mit Essigsäure, so trübt es sich stark, es enthält somit noch Eiweissstoffe gelöst.

Mischt man die Milch in steigendem Verhältnisse mit concentrirter Chlornatriumlösung, so wird Folgendes beobachtet.

In der Kälte rufen hervor:

2 Theile Milch und	2 Theile Lösung.	.keine Fällung.
2	3	
2	4	
2	5	
2	6	
2	8	
1 Theil	5	
1	10	

In der Kälte wird die Milch von der Steinsalzlösung gar nicht gefällt.

Bei 50° C. zeigen:

2 Theile Milch und	2 Theile Lösung.	.keine Fällung.
2	3	
2	5	
2	6	
1 Theil	4	
1	8	deutliche

Bei 100° C. rufen hervor:

2 Theile Milch und	1 Theil Lösung	.keine Fällung.
2	2 Theile	
2	3	
2	4	
2	6	

Die concentrirte Chlornatriumlösung hat somit in der Kälte kein Fällungsvermögen und bei 50° C. nur ein schwaches Fällungsvermögen für die Milch. Bei der Siedehitze ist das Fällungsvermögen ziemlich gross. Das Fällungsvermögen des Chlornatriums für die Milch ist also im Allgemeinen grösser als das des Natriumsulfats und kleiner als das des Magnesiumsulfats.

Bezüglich der Opalescenz zeigen die mit Chlornatrium vorgenommenen Versuche eine Ähnlichkeit mit jenen des Natriumsulfats. Auf 50° erwärmte und bei derselben Temperatur filtrirte Proben liefern fast klare Filtrate, welche ihre Durchsichtigkeit nicht ändern.

Bis zu 50° C. erwärmte und kalt filtrirte Proben lassen in ihren Filtraten eine schwache Trübung und Opalescenz erkennen.

Ein ähnliches Verhältniss wie bei den letztgenannten Proben wird auch bei bis zu 100° C. erwärmten Proben beobachtet.

Das beweist, dass bei den genannten Temperaturen in der kochsalzhaltigen Milch keine vollständige Coagulation stattfindet, sondern dass ein Theil des entstandenen Präcipitates auf

Rechnung der Aussalzung zu bringen ist, in der erkalteten Flüssigkeit sich löst und die Trübung und Opalescenz hervorruft.

Zweite Versuchsreihe.

30 cm^3 Milch werden mit 90 cm^3 Chlornatriumlösung und mit einigen Tropfen Hühnereiweiss gemischt und bei 100° C. zur Gerinnung gebracht. In dem neutralisirten Coagulationsfiltrat scheidet sich auf überschüssiges, festes Chlornatrium fast gar kein Niederschlag aus, dagegen ruft die Essigsäure darin eine sehr starke Fällung hervor. Offenbar ist neben dem Albumen auch ein Theil der Eiweisskörper der Milch coagulirt und beim Filtriren entfernt worden. Das Chlornatrium eignet sich somit ebensowenig wie das Magnesiumsulfat zur Wiederholung der Glaubersalzversuche.

Zu entscheiden bleibt noch, ob das ClNa die Substanz *a* in der glaubersalzhältigen Milch (im Coagulationsfiltrat) aussalzt. Zu dem Behufe wurden 20 cm^3 Milch nach der oft genannten Methode coagulirt und das neutralisirte Filtrat wurde mit überschüssigem Steinsalz versetzt und gemischt.

Hiebei scheidet sich die Substanz *a* sehr langsam aus. Sie wird filtrirt und in ihrem Filtrat die Substanz *b* mittelst überschüssiger Essigsäure zur Fällung gebracht.

Die mit feinen Krystallen gemischte zähe Substanz *a* wird im Wasser gelöst, mit Essigsäure ausgefällt, mit Wasser gewaschen, getrocknet und gewogen. Ihr Gewicht beträgt annähernd 0·50, während dasselbe bei der Substanz *b* 0·06 gefunden wird. Die Zahlen stimmen mit den durch Aussalzung der Substanzen mittelst Magnesiumsulfat und Natriumsulfat erhaltenen annähernd überein.

In dem Verhalten zum Lab gleichen diese Eiweissstoffe den durch die Glaubersalzfällung erhaltenen. Beide enthalten Phosphor.

Das Filtrat der Substanz *b* trübt sich auf weiteren Essigsäurezusatz nicht, trübt sich nicht beim Kochen, gibt auch nicht die für die Eiweissstoffe charakteristischen Farbenreactionen.

Das Filtrat der unter den oberwähnten Verhältnissen coagulirten Milch enthält demnach ausser den beiden Substanzen *a* und *b* keinen weiteren Eiweisskörper.

Dritte Versuchsreihe.

Um schliesslich die Gewissheit zu haben, dass das ClNa in der reinen Milch dieselben Veränderungen hervorruft, wurde die Milch direct mit ClNa ausgesalzen.

Nach längerem Rühren der mit überschüssigem Steinsalz versetzten Milch erhält dieselbe eine dickliche Consistenz. Die Eiweisssubstanz *a* scheidet sich aus. Wird die Masse aufs Filter gebracht, so tropft von ihr ein klares Filtrat ab.

Die Substanz *a* trocknet auf dem Filter zu einer krustenartigen, bröckligen Masse ein. Im Wasser ist sie löslich und mit Essigsäure wieder total fällbar.

Das Filtrat der Substanz *a* gerinnt beim Kochen und wird nach Zusatz von überschüssiger Essigsäure in der Kälte gefällt.

Nach dem Abscheiden der Substanz *b* mittelst Essigsäure, von welcher eine grosse Menge genommen werden muss, ist in dem Filtrate auf weiteren Essigsäurezusatz weder in der Kälte, noch in der Siedehitze eine weitere Fällung hervorzubringen. Wird jedoch das Filtrat der Substanz *b* vorsichtig mit Natriumcarbonat neutralisirt und dann gekocht, so trübt es sich zum Beweise, dass es nicht eiweissfrei ist. Die Trübung ist übrigens auch nach dem Übersättigen mit ClNa durch Kochen zu erreichen. Die Eiweisssubstanz, um die es sich hier handelt, ist das Lactalbumin (und Lactoglobulin).

Zur Abschätzung des quantitativen Verhältnisses der Substanzen *a* und *b* wurde die Substanz *a* mittelst Alkohol und Äther entfettet, getrocknet und gewogen. Die Substanz *b* wurde auf einem gewogenen Filter mit Wasser gewaschen, getrocknet und dann ihr Gewicht bestimmt.

Das Gewicht der Substanz *a* betrug 0·50, das der Substanz *b* 0·08. Die Gewichte stimmen also mit den bei den früheren Aussalzungen gefundenen Werthen (bei Natriumsulfat 0·57 für *a*, 0·07 für *b*; bei Magnesiumsulfat 0·56 für *a* und 0 10 für *b*) annähernd überein.

Zum Lab verhalten sich beide Substanzen ähnlich wie bei den früheren Versuchen mit Magnesium- und Natriumsulfat.

Die Substanz *a* ist calciumhältig. Wird sie jedoch im Wasser gelöst und daraus mit Essigsäure gefällt, getrocknet und verascht und dann wieder auf Ca geprüft, so erscheint sie kalkfrei. Der ganze Kalk ist offenbar durch die Essigsäure von der Caseogensubstanz abgespalten worden und in das Filtrat übergegangen.

Die mit Essigsäure gefällte Substanz *b* ist kalkfrei. Sie erweist sich auch dann, wenn sie statt mit Essigsäure gefällt zu werden, mit Magnesiumsulfat in Substanz ausgesalzen und mit concentrirter Bittersalzlösung gewaschen wurde, als kalkfrei.

Die vorangeführten Versuche lehren, dass das Chlornatrium bei der Aussalzung der Milch dem Natrium- und Magnesiumsulfat sich analog verhält. Hiebei ist es gleichgiltig, ob die Aussalzung in dem nach unserer Methode bereiteten Coagulationsfiltrat oder in der reinen Milch geschieht. Das Filtrat der aus der reinen Milch erhaltenen Substanz *b* enthält noch Lactalbumin (und Globulin). Im Coagulationsfiltrat kann das Lactalbumin, wie schon erwähnt, nicht vorkommen, weil es durch die Coagulation mit dem Albumen und mit Fett zugleich entfernt worden ist.

IV. Die Aussalzung mit zwei Salzen.

Erste Versuchsreihe.

In dem Filtrate der mit Natriumsulfat, Magnesiumsulfat oder Chlornatrium aus der Kuhmilch gefällten Eiweisssubstanz *a* wird durch ein anderes Salz dieser Reihe auch die Substanz *b* gefällt oder ausgesalzen. Die Aussalzung findet in dem Coagulationsfiltrat geradeso statt, wie in der reinen Milch. Durch gleichzeitiges Eintragen von zwei Salzen in das Coagulationsfiltrat oder in die reine Milch werden beide Substanzen *a* und *b* zugleich ausgesalzen. Dies ergibt sich aus den nachfolgenden Versuchen:

a) 20 cm^3 Milch werden nach der aus den früheren Versuchen bekannten Methode coagulirt und filtrirt. Das neutralisirte Filtrat wird mit überschüssigem Natriumsulfat gemischt. Die Substanz *a* scheidet sich aus. Das Filtrat derselben wird

mit überschüssigem Steinsalz versetzt und gerührt. Die Flüssigkeit trübt sich durch die ausgeschiedene Substanz *b*. In dem Filtrate der Substanz *b* weisen weder die Essigsäure noch Farbenreactionen weitere Eiweisskörper nach.

b) In dem Filtrate der mit Natriumsulfat ausgesalzenen Substanz *a* salzt überschüssiges Magnesiumsulfat die Substanz *b* aus. Das Filtrat der Substanz *b* ist eiweissfrei.

c) Das Coagulationsfiltrat wird gleichzeitig mit einer Mischung von Natrium- und Magnesiumsulfat versetzt und gerührt. Eine starke Fällung tritt auf. In dem Filtrate ist kein Eiweisskörper nachweisbar. Es sind somit sowohl die Substanz *a*, als auch die Substanz *b* ausgesalzen worden.

Zweite Versuchsreihe.

Wird statt dem Coagulationsfiltrate reine Milch zu den Aussalzungsproben verwendet, so ist das Resultat dasselbe wie bei den vorangeführten Versuchen.

a) Vor dem Aussalzen der Milch mit Natriumsulfat wird dieselbe durch Aufrahmung und nachheriges Centrifugiren möglichst entfettet. In dem klaren Filtrat der Substanz *a* fällt überschüssiges ClNa die Substanz *b*. Das Filtrat der letzteren enthält noch Lactalbumin.

b) In dem Filtrate der mit Natriumsulfat ausgesalzenen Substanz *a* salzt das Bittersalz die Substanz *b* aus.

c) Durch gleichzeitiges Eintragen von Natrium- und Magnesiumsulfat in die Milch werden beide Substanzen *a* und *b* ausgesalzen. In ihrem Filtrate ist noch Lactalbumin nachweisbar.

d) 20 cm^3 Magermilch werden mit ClNa ausgesalzen. Im Filtrate der Substanz *a* salzt überschüssiges Magnesiumsulfat die Substanz *b* aus.

Eine Probe der Substanz *b* löst sich schnell in destillirtem Wasser und trübt sich in wässeriger Lösung nicht beim Kochen.

Eine andere Probe der im Wasser gelösten und mit einigen Tropfen 1% Chlorcalciumlösung versetzten Substanz *b* gibt auf Labzusatz bei 44° C. eine höchst schwache Trübung.

In dem Filtrate der mit Magnesiumsulfat ausgesalzenen Substanz *b* ist noch ein Eiweisskörper enthalten, denn dasselbe gerinnt beim Kochen und trübt sich auf Essigsäurezusatz, wird aber vom Labextract nicht beinflusst. Diese Substanz ist das Lactalbumin.

e) 20 cm^3 Milch werden im Überschusse mit Bittersalz versetzt und bis zur eingetretenen Fällung im Becherglase gerührt, dann filtrirt. Das klare Filtrat wird in zwei Theile getheilt. In den einen Theil wird Steinsalz, in den anderen Glaubersalz eingetragen. Nach längerem Rühren tritt in beiden Theilen eine starke Trübung auf, zum Beweise, dass eine Aussalzung stattgefunden hat.

In dem mit Magnesiumsulfat gesättigten Filtrat der Substanz *a* hat also sowohl das ClNa, als auch das Na_2SO_4 die Substanz *b* ausgesalzen. In den Filtraten der Substanz *b* ist noch die coagulirbare Substanz Lactalbumin nachweisbar.

f) Durch gleichzeitiges Eintragen von ClNa und $MgSO_4$ in die reine Milch werden die Substanzen *a* und *b* zusammen gefällt (Caseïnogen). Im Filtrate ist noch das Lactalbumin enthalten.

V. Schlussfolgerungen.

Als Ergebnisse unserer Untersuchungen sind folgende anzuführen:

1. Hammarsten's Angabe, dass in der Kuhmilch nur einerlei Caseïnogen (Caseïn) vorkommt, konnte bestätigt werden.

2. Durch Sättigen mit Natriumsulfat, Magnesiumsulfat und Chlornatrium wird, wenn jedes Salz für sich angewendet wird, das Caseïnogen nicht im unveränderten Zustande ausgesalzen, sondern in zwei phosphorhältige Eiweisskörper gespalten, daher jene Autoren, welche durch Anwendung eines einzigen der genannten Salze das Caseïnogen aus der Milch zu isoliren suchten, nicht das unveränderte Caseïnogen, sondern ein Spaltungsproduct desselben, das sich ihm ähnlich verhält (unsere Substanz *a*), analysirten.

3. Unverändert wird das Caseïnogen ausgefällt aus der reinen Kuhmilch durch wenig Essigsäure; ferner ist es denkbar, dass es auch durch gleichzeitige Sättigung mit zweien der

oben genannten Salze zur Ausscheidung im unveränderten Zustande gebracht werden kann, wofür die am Schlusse der Abhandlung angeführten Versuche mit Aussalzung durch zwei Salze sprechen.

Der Verfasser ist mit der reinen Darstellung und Analyse der beiden Substanzen *a* und *b* beschäftigt und die Resultate werden später mitgetheilt werden.
